地黄 *RgCDPK* 基因的克隆与表达分析

原增艳[1,3]，宋小锋[1,3]，朱畇昊[2*]
（1. 新乡医学院三全学院，河南 新乡 453003；2. 河南中医药大学 药学院，郑州 450046；3. 河南省山楂综合利用工程研究中心，河南 新乡 453003）

摘要：钙依赖型蛋白激酶(calcium-dependent protein kinases, CDPKs)是高等植物细胞中重要的钙离子信号受体，在植物抵御逆境胁迫过程中发挥着重要作用。本研究以地黄为材料，设计特异引物，克隆地黄 *RgCDPK* 基因全长序列，并使用在线软件进行生物信息学分析，采用荧光定量 PCR 技术进行组织特异性分析。结果表明：（1）克隆得到的地黄 *CDPK* 基因长度为 1 770 bp，编码个 589 个氨基酸；（2）多序列比对和结构分析显示，该蛋白含有钙依赖蛋白激酶典型结构域丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶区及 EF-手性区.系统进化分析表明其与拟南芥 AtCDPK28 的同源关系最近，因此命名为 *RgCDPK*(Genbank 登录号为 MT024235)；（3）组织特异性分析得出 *RgCDPK* 在地黄叶中表达量最高。本研究成功克隆出地黄 *CDPK* 基因，且发现该基因在不同组织中的表达存在差异，为以后深入研究 *CDPK* 在地黄连作障碍等生物及非生物胁迫中的分子机制提供理论基础。

关键词：地黄，钙依赖蛋白激酶，生物信息学，组织特异性
中图分类号: Q943.2　　**文献标识码**: A

Cloning and expression analysis of calcium-dependent protein kinase genes in *Rehmannia glutinosa*

YUAN Zengyan[1,3], SONG Xiaofeng[1,3], ZHU Yunhao[2*]
（1. *Sanquan College of Xinxiang Medical University*, Xinxiang 453003, Henan, China; 2. *School of Pharmacy, Henan University of Traditional Chinese Medicine*, Zhengzhou 450046, China; 3. *Henan Hawthorn Utilization Engineering Center*, Xinxiang 453003, Henan, China）

Abstract: Calcium-dependent protein kinases (CDPKs) are important calcium sensors in higher plants, which play an important role in plant resistance to envirenment stress.In this study, a full-length cDNA of *RgCDPK* gene was cloned from *Rehmannia glutinosa*. Meanwhile, the bioinformatics analysis was used the online

---

基金项目：国家自然科学基金(81603232)；新乡医学院三全学院创新团队（STD201603）[Supported by the National Natural Science Foundation of China(81603232); Innovation team of Sanquan College of Xinxiang Medical University（STD201603）]。

作者简介：原增艳（1985-），女，河南新乡人，硕士，讲师，主要从事生物制药方向研究，（ E-mail）songxiaofeng109@163.com。
[*]**通信作者**：朱畇昊，博士，副教授，主要从事药用植物分子生物学研究，（E-mail）guxinhan123@163.com。

software, quantitative real-time PCR technique was used to detect *RgCDPK* expression level in different tissues. The results were as follows: (1)The full-length cDNA sequence of *RgCDPK* gene was 1 770 bp and encoded 589 amino acid residues; (2)Sequence alignments and structural analysis revealed that its protein contained serine/threonine protein kinase region and EF-hand region, which were typical domains of calcium-dependent protein kinase. Phylogenetic analysis showed the highest similarity with *Arabidopsis* AtCDPK28. Thus, the gene was defined as *RgCDPK* (Genbank accession No. MT024235); (3)The expression analysis of *RgCDPK* in different tissues revealed that high transcript levels occurred at leaves. In this study, the *CDPK* gene of *Rehmannia glutinosa* was successfully cloned, and the expression of the gene in different tissues was found to be different. The results of this study provide theoretical basis for further study on the function of *CDPK* in biotic, abiotic stresses and continuous cropping obstacles.

Keywords: *Rehmannia glutinosa*, calcium-dependent protein kinase, bioinformatics, tissue specificity

Ca^{2+} 是植物细胞中重要的第二信使，当一些刺激信号使胞内Ca^{2+}浓度增加至阈值时，产生信号并传递。钙依赖型蛋白激酶(calcium-dependent protein kinase, CDPKs)是一种普遍存在的蛋白激酶，当CDPK与Ca^{2+}结合后，CDPK被活化发挥作用（Guo et al., 2019）。CDPK在植物响应高温、干旱、紫外等非生物胁迫和内生菌、虫害等生物胁迫中起重要作用，同时，CDPK也在植物的生长与发育、胞内激素调节等方面都发挥重要作用（Romeis et al.,2000; Geiger et al.,2010）。*CDPK*基因具有4 个典型的结构域，依次分别为，N 末端的可变区、催化区、自抑制区和调控区。调控区一般含有多个Ca^{2+} 结合的EF 手型结构（EF-hand）。Ca^{2+}与EF-hand结合后， CDPK空间结构发生变化，导致自抑制区的抑制作用解除，促使CDPK 恢复其蛋白激酶活性，进而磷酸化下游调控因子，将信号传递至下游调控网络，从而完成对信号的响应（Hetherington et al.,1982； Harmon et al.,1987）。CDPK在植物根、茎、叶、花、果实和种子等组织中广泛分布。通过基因组数据分析发现，拟南芥、水稻、玉米基因组种分别有34、31和40个*CDPK*基因（武志刚等,2018）。多种药用植物如铁皮石斛（盛况等,2017）、天山雪莲（田晓涵等,2016）和龙血树（张浩等,2010）中的*CDPK*基因也已被克隆，但地黄*CDPK*基因克隆的研究还未见报道。

地黄为玄参科植物地黄属植物地黄(*Rehmannia glutinosa*)的新鲜或干燥块根，具有清热生津、凉血止血、滋阴补血等功效（李慧芬,2014）。地黄栽培历史悠久，历代名医对优质地黄产地的认识几经变迁，自明朝以来，即确立了怀庆地黄的道地地位。怀地黄具有悠久的药用历史，用药需求不断增加，但是在栽培生产上，地黄具有严重的连作障碍，每茬收获后需要 8~10 a 后才能复种（刘红彦等,2006）。张重义等（2013）研究发现，地黄可能依赖钙离子信号系统传递自毒物质信号，导致连作危害，其中 *CDPK* 家族基因在其中也发挥了重要作用。杨楚韵等（2017）在地黄中鉴定出了 21 个可能参与连作地黄钙信号感知、传导和响应连作胁迫进程的 *CDPK* 家族基因，但并未对其进行克隆及表达分析。本研

究前期进行了地黄组培苗的转录组测序及分析，从中查找到 1 条新的编码钙依赖性蛋白激酶的基因，并通过比对发现该基因序列完整。实验分析了该基因编码蛋白的理化特性、结构特征和亚细胞定位，检测了其在不同组织中的表达特性，以期为深入研究其在地黄连作障碍等生物及非生物胁迫中的分子机制提供基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

地黄（*Rehmannia glutinosa*）取自河南中医药大学植物园，经朱畇昊副教授鉴定为玄参科地黄。所用地黄品种为“沁怀”，在 6 月份地黄开花时，挖取地黄植株整株，洗净后分别取根、叶、花组织，用锡纸包好，液氮冷冻后置于-80 ℃冰箱保存，以备后续使用。

1.2 RNA 的提取及 cDNA 的合成

取新鲜地黄叶片、根、花瓣各 0.1 g，在液氮中速冻，用 TRIzol 试剂（Thermo Fisher Scientific）提取 RNA。RNA 使用 1%琼脂糖电泳凝胶检测纯度，检测合格后用于后续 cDNA 的合成。取 7 μL RNA 使用 TIANScript cDNA 第一链合成试剂盒（天根生化科技(北京)有限公司）合成 cDNA，具体操作方法参照试剂盒说明书进行。

1.3 地黄 *CDPK* 基因的克隆

以地黄组培苗转录组数据库中一条注释为 *CDPK* 的 unigene 全长序列为参考序列，使用 Primer Premier 5 设计特异性引物。PCR 反应体系为 20 μL，具体组分如下：模板 cDNA 2.0 μL、2×Es Taq mix 10 μL、上下游引物（RgCDPK-F，RgCDPK-R）各 1.0 μL、其余用 ddH_2O 补足。反应程序设计如下：95 ℃，3 min；95 ℃，45s，58 ℃，45 s，72 ℃ ，2 min，35 个循环；72 ℃延伸 10 min。PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测后，纯化回收得到目的片段，使用 pMD19-T 载体进行目的片段的连接后转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞，转化后产物于含氨苄青霉素的 LB 固体培养基上 37 ℃培养过夜后筛选白斑，菌液经 PCR 验证后送至生工生物工程股份有限公司有限公司测序。

1.4 地黄 *CDPK* 基因的生物信息学分析

使用 ORF finder(http://www.bioinformatics.org/sms2/orf_find.html) 进行开放阅读框查找；使用 BLAST(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)进行序列的同源性搜索；使用 Protparam (http://www.expasy.ch/tools/protparam.html) 预测蛋白的分子量等理化性质；蛋白信号肽预测分析使用在线软件 SinalP4.1（http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/）；使用 TMpred（https://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_form.html）预测蛋白跨膜区；使用 NPSA server（http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopm.html）预测蛋白二级结构，使用 PSORT(https://www.psort.org/)预测蛋白亚细胞定位；使用 SMART（http://smart.embl-heidelberg.de/）预测蛋白功能域；蛋白磷酸化位点预测使用 NetPhos 3.1（http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/）在线软件；使用 MEGA6.0 构建系统和进化树，使用 DNAMAN 进行多序列比对。

1.5 荧光定量 PCR

根据荧光定量引物设计方法，用 Primer 5.0 设计引物 qRgCDPK-F、qRgCDPK-R，以 *TiP*41 为内参

基因。参照荧光定量 PCR 试剂盒的步骤，配成 20 μL 的体系：2×SYBR Green PCR Master Mix 10 μL、引物各 0.4 μL、QN Rox Reference Dye0.1 μL 、ddH_2O 7.1 μL、模板 cDNA 2 μL。 PCR 反应程序如下：预变性 95 ℃ 20 s；变性 95 ℃ 1 s；退火 56 ℃ 20 s；延伸 95 ℃ 1 s。 40 个循环。60 ℃ 20 s，95 ℃ 1 s 进行扩增。反应结束后，根据得到的 Ct 值，利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$，分别计算不同组织的表达量。

表 1 引物序列及用途

Table 1 Primer sequences and use

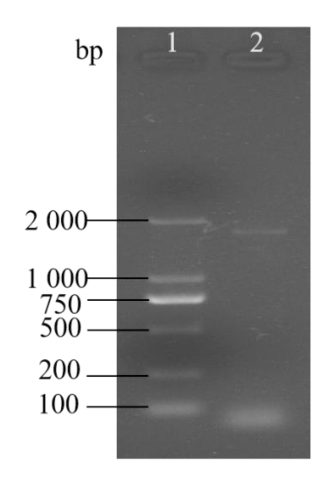
引物名称 Gene name	引物序列 Primer Sequence	用途 Use	扩增子大小 Amplified length (bp)
RgCDPK-F	GAGAAATGGGTAGCTGTT	基因克隆 Gene clone	1 808
RgCDPK-R	TCACAAGCGCCTTCAAAA		
qRgCDPK-F	TCTCAGAAACAAGCCCGACT	荧光定量 Real-time PCR	154
qRgCDPK-R	TTCACCTCCTTCTCGAACCC		
TiP41-F	ATTGGGTAGATTGCCAGGAG	荧光定量内参 Reference gene of real-time PCR	106
TiP41-R	CCATTGCAGCCAATTCATC		

2 结果与分析

2.1 *RgCDPK* 基因的克隆

提取后的 RNA 经 1%琼脂糖凝胶电泳检测可见三条清晰条带，条带无降解及杂带，说明 RNA 质量较高，无降解，可用于后续实验。如图 1 所示，特异性条带长度约为 1 800 bp。将 PCR 产物克隆到 pMD19-T 载体后挑选阳性克隆双向测序。测序结果拼接后经 ORF Finder 预测，该序列含有一个大小为 1 770 bp 的完整的开放阅读框，编码 589 个氨基酸。测序结果使用 DNAMAN 软件与转录组序列进行多序列比对发现，克隆所得序列与转录组所得序列完全一致。通过 BLAST 程序检索，该片段与紫花风铃木（*Handroanthus impetiginosus*，PIN08903.1）、猴面花（*Erythranthe guttata*，XP_012857661）、旋蒴苣苔（*Dorcoceras hygrometricum*，KZV40794.1）CDPK 蛋白序列的同源性分别为 89%、86%、82%。

采用 InterProScan 在线工具预测对地黄 RgCDPK 蛋白的保守结构域进行分析，RgCDPK 具有 5 个保守结构域，分别为在 126 ~ 386 位的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶催化结构域和 4 个 EF-hand，钙离子结合结构域(433-461,470-498,512-540,542-570)由此确定该序列为地黄 *CDPK* 基因的 cDNA 全长序列，将其命名为 *RgCDPK*，将其序列提交至 GenBank，获得登录号为 MT024235。



泳道 1. DNA 标准分子量；**泳道 2**. *RgCDPK* 基因扩增产物。

Lane 1. DNA maker; **Lane 2**. PCR amplification product of *RgCDPK*.

图 1　*RgCDPK* 基因克隆

Fig.1 Gene clone of *RgCDPK*

2.2　*RgCDPK* 的生物信息学分析

2.2.1　RgCDPK 蛋白质理化性质及疏水性分析

RgCDPK 基因的开放阅读框大小为 1 770 bp，共编码 589 个氨基酸残基。RgCDPK 蛋白质的相对分子质量为 66.06 kD；理论等电点（PI）为 5.91，原子组成 $C_{2908}H_{4624}N_{832}O_{890}S_{18}$，总原子数为 9 272，带负电的氨基酸有 80 个(Asp + Glu)，带正电的氨基酸有 89 个(Arg + Lys)。蛋白质稳定性分析发现 CsCDPK17 的脂肪指数为 73.06，不稳定系数为 45 蛋白，推测其为不稳定蛋白质。总平均亲水系数为 -0.584，属于亲水性蛋白。

2.2.2　RgCDPK 蛋白质特性分析

使用 TMpred 软件，预测 RgCDPK 蛋白的跨膜区，结果显示，RgCDPK 蛋白可能存在一个跨膜螺旋，位置为 309~327，方向由外到内。使用 SignalP-4.1 分析 RgCDPK 的信号肽，结果显示无明显信号肽。RgCDPK 可能定位于叶绿体。通过在线软件对地黄 RgCDPK 蛋白进行磷酸化位点预测，结果如下：RgCDPK 蛋白整个多肽链有 71 个磷酸化位点（>0.5），其中丝氨酸 42 个，苏氨酸 23 个，酪氨酸 6 个。

2.2.3　RgCDPK 的结构预测

使用 NPSA server 在线软件预测 RgCDPK 的二级结构，结果表明 RgCDPK 蛋白由 41.94%的 α-螺旋、12.05%的延伸链、6.62%的 β-转角和 39.39%的无规卷曲组成。使用 Swiss-model 在线软件预测地黄 RgCDPK 的三级结构。同源建模结果显示（图 2），　RgCDPK 与拟南芥 CDPK（SMTL ID :3q5i.1）相似度为 33.94%,具有较高可信度（>30%）。

通过在线软件对地黄 RgCDPK 蛋白进行磷酸化位点预测，结果如下：RgCDPK 蛋白整个多肽链有 71 个磷酸化位点（>0.5），其中，丝氨酸 42 个，苏氨酸 23 个，酪氨酸 6 个。



图 2 RgCDPK 蛋白的三级结构

Fig.2 RgCDPK protein tertiary structure prediction

2.2.4 *RgCDPK* 的系统进化及同源性分析

使用 MEGA6.0 构建系统进化树。拟南芥 CDPK 蛋白包括Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ四个亚族，其中 AtCDPK1、AtCDPK2、AtCDPK26 属于Ⅰ家族；AtCDPK15、AtCDPK19、AtCDPK23、AtCDPK29、AtCDPK33、AtCDPK34 属于Ⅱ家族；AtCDPK13、AtCDPK14、AtCDPK24 属于Ⅲ家族；AtCDPK16、AtCDPK18、AtCDPK28 属于Ⅳ家族。如图 3 所示，RgCDPK 与 AtCDPK28 处于同一分支，说明其可能属于 CDPK Ⅳ家族，与拟南芥 AtCDPK28 同源性最近。

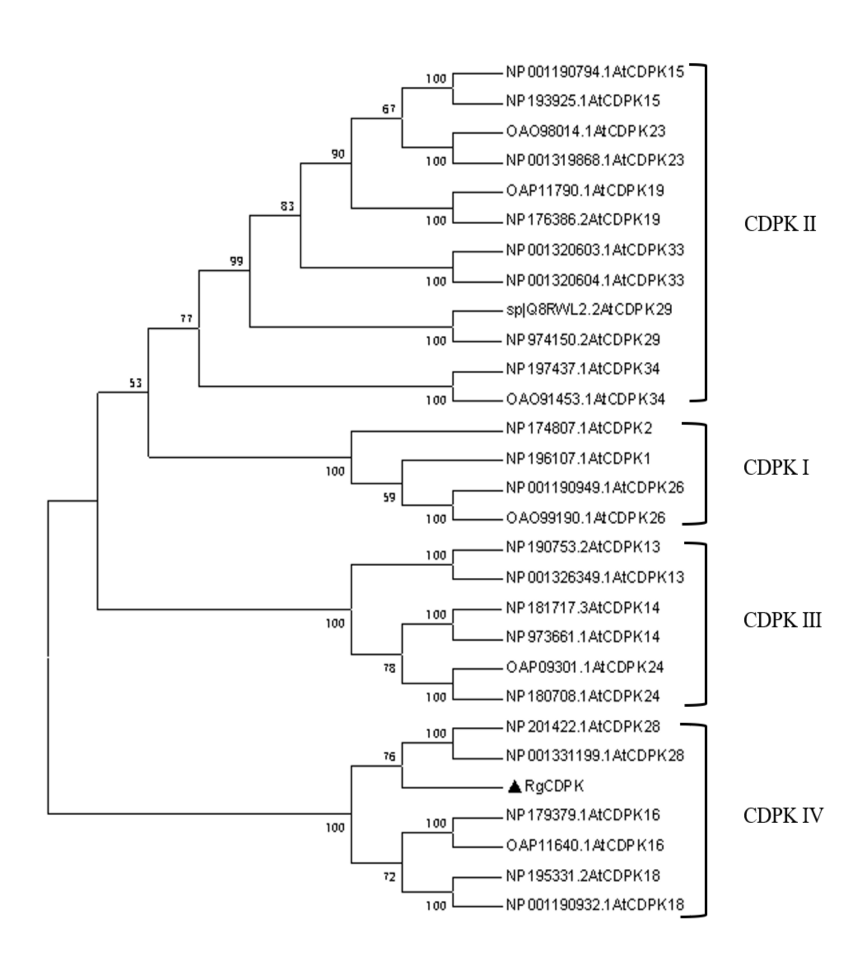
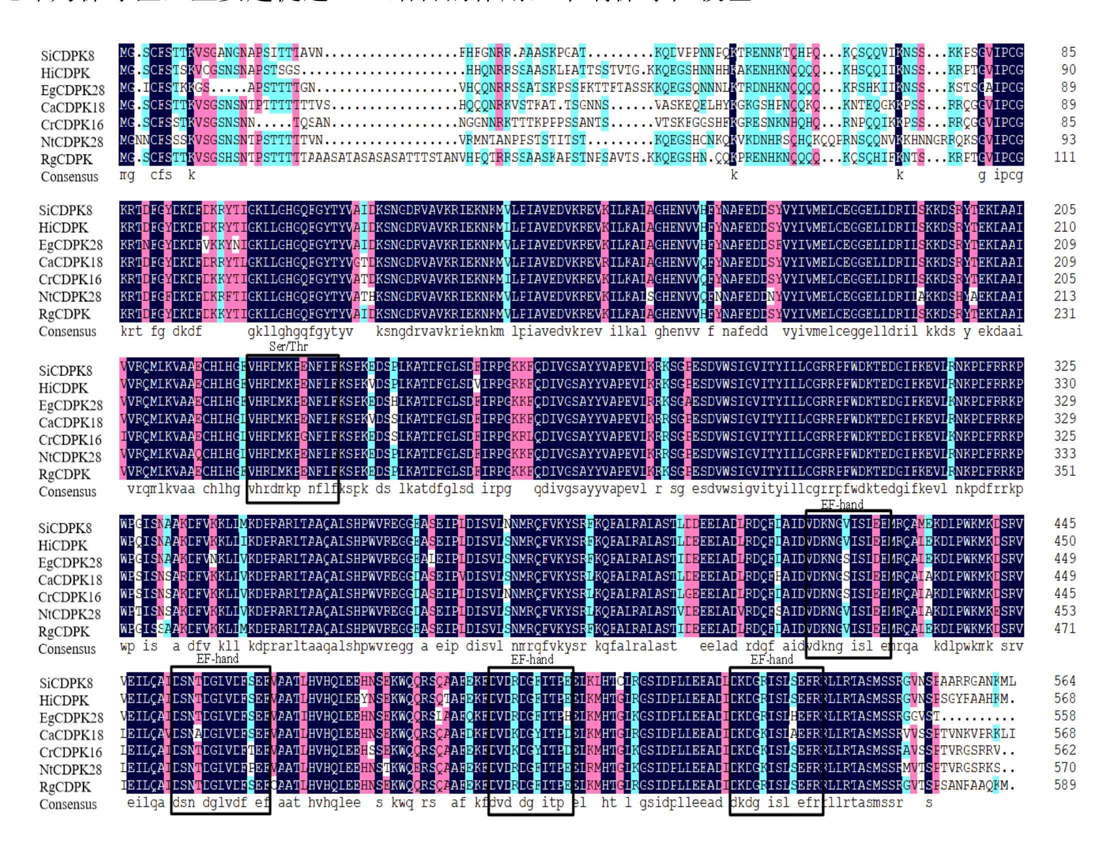


图 3　RgCDPK 蛋白的系统进化树

Fig.3 Phylogentic tree of RgCDPK protein

运用 DNAMAN 在线软件，将芝麻 SiCDPK8、紫花风铃木 HiCDPK 等与地黄 RgCDPK 进行多序列比对。如图 4 所示，RgCDPK 具有 4 个典型的 CDPK 结构域：可变区、催化区、自抑制区和调控区。可变区位于 N 端，同源性极低；蛋白激酶区保守性较高，由约 300 个氨基酸构成，因该区含有起催化作用的 Ser/Thr 蛋白激酶序列，因此也可称为催化区，主要起与 ATP 结合的作用；在 C 端有 4 个 EF-hand 结构，此即为保守区，主要起促进 Ca^{2+}结合的作用，末端保守性较差。



芝麻 SiCDPK8（XP_011099853.1），紫花风铃木 HiCDPK（PIN08903.1），猴面花EgCDPK28（XP_012857661），咖啡豆 CaCDPK18（XP_012857661.1），长春花 CrCDPK16（AGH25068.1），烟草 NtCDPK28（XP_016507827.1）。

Sesamum indicu SiCDPK8（XP_011099853.1）, *Handroanthus impetiginosus* HiCDPK（PIN08903.1）, *Erythranthe guttata* EgCDPK28（XP_012857661）, *Coffea canephora* CaCDPK18（XP_012857661.1）, *Catharanthus roseus* CrCDPK16（AGH25068.1）, *Nicotiana tabacum* NtCDPK28（XP_016507827.1）.

图4 RgCDPK同源序列比

Fig.4 RgCDPK multiple alignment of amino sequences

2.3 *RgCDPK*的组织表达分析

使用荧光定量PCR技术分析地黄块根、叶、花瓣中的表达特性。结果显示（图5），*RgCDPK*在地黄块根、叶和花瓣中均有表达，在叶中的表达量最高，而在花瓣中的表达量最低。在根和叶中的表达量差异较小。

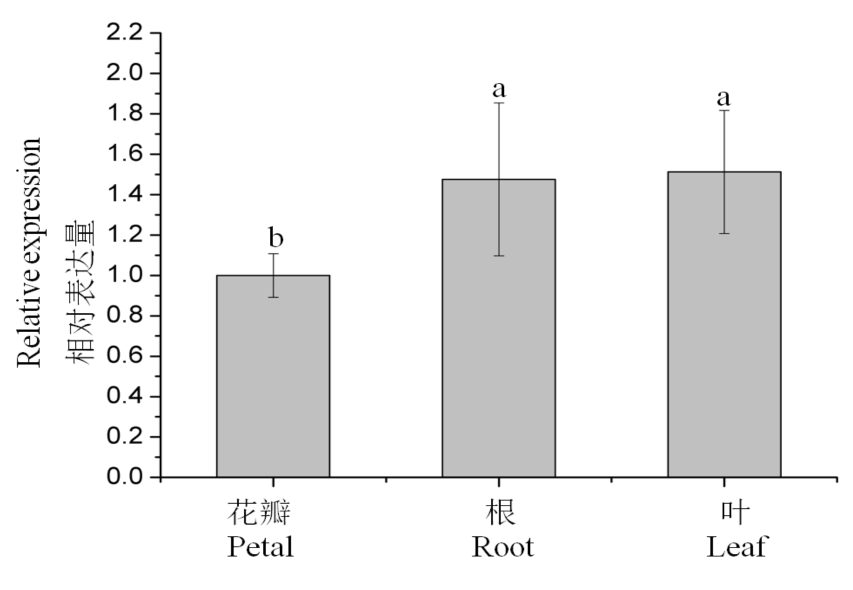


图5 *RgCDPK* 组织特异性分析

Fig.5 Tissue-specific analysis of *RgCDPK*

3 讨论

本研究克隆得到一条新的完整的*RgCDPK*基因，其开放阅读框大小为1 770 bp，共编码589个氨基酸残基。对*RgCDPK*基因的结构及编码的蛋白进行分析发现，其保守结构具有4 个典型的可变区、催化区、自抑制区和调控区，符合钙依赖蛋白激酶典型结构特征。*CDPK*在植株中分布广泛，在根、叶、花、果实及种子等各器官中均能检测到*CDPK*基因的表达（Raices et al., 2003；白晓璟等，2019；雷蕾等，2019；Li et al., 2019）。本研究通过荧光定量PCR对*RgCDPK*在地黄不同组织中的特异性表达结果进行分析，发现*RgCDPK*在叶中表达量最高，其次是根，在花瓣中的相对表达量最少。铁皮石斛*DoCDPK*1也属于*CDPK* Ⅳ家族，但其在叶片中表达量最高，其次是茎，在根中表达量最低（盛况等，2017）。说明*RgCDPK*的表达具有组织特异性，且不同植物中的*CDPK*即使属于同一亚家族，其表达模式也可能不同。

本研究克隆得到了1条新的*CDPK*基因，系统进化分析发现，其可能属于*CDPKD*家族，与拟南芥*AtCDPK*28同源性最近。*AtCDPK*28缺失引起拟南芥Nacl抗性降低，而其超表达则增加拟南芥对渗透胁迫的耐受性。同属于*CDPKD*家族的*DoCDPK*1在低温、ABA与盐胁迫均可被诱导，因此推测其可能在地黄渗透胁迫等逆境环境中发挥调节作用。连作障碍是指连续在同一土壤上栽培同种作物或近缘作物引起的植物生长发育异常（王刚等，2019），连作过程中植物也受到一定程度的胁迫。已经有研究发现钙信号系统在地黄连作障碍形成过程中扮演着重要的角色（郭冠瑛等，2013），而钙依赖蛋白激酶 (CDPK)（张毓露等，2012）在地黄连作的生理响应中可能也发挥着重要作用。*CDPK*11基因在连作地黄膨大前、中、后期的表达量均显著高于头茬地黄，而*CDPK*20在膨大中期连作地黄中表达量显著高于头茬地黄，其他时期均下调（杨楚韵等，2017）。这可能是不同CDPK蛋白通过相互补充和相互增益在地黄连作障碍的形成过程中承担不同的角色，从而介导地黄连作障碍的形成。*RgCDPK*基因作为地黄*CDPK*基因家族中的一员，可能在地黄连作反应中发挥一定的功能，但本研究未对其在地黄连不同时期、不同组织中的表达特性进行研究，因此其如何参与地黄连作障碍中Ca^2信号转导及具体的转导途径等均并不清楚，

还需要进一步进行深入研究。

参 考 文 献:

BAI XJ, LIAN XP, WANG YK, et al., 2019. Cloning and analysis of *BoCDPK*14 in self-incompatibility *Brasscia olerace*[J]. Acta Agron Sin, 45(12):1773-1783. [白晓璟 ,廉小平, 王玉奎, 等, 2019. 甘蓝 SI 相关基因 *BoCDPK*14 的克隆与分析[J]. 作物学报, 45(12):1773-1783.]

CHENG S H, WILLMANN M R, CHEN H C, et al.,2002. Calcium signaling through protein kinases. The *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase gene family[J]. Plant physiol, 129(2): 469-485.

GAO QY, XIONG TT, LI XP, et al., 2019. Calcium and calcium sensors in fruit development and ripening[J]. Sci Hortic, 253.

GEIGER D, SCHERZER S, MUMM P, et al., 2010. Guard cell anion channel SLAC1is regulated by *CDPK* protein kinases with distinct Ca^{2+} affinities[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 107 (17):8023-8028.

GUO GY, LI MJ, WANG PF, et al., 2013. Abnormal changes of calcium signal system in continuous cropping obstacle of *Rehmannia glutinosa*[J]. Chin J Chin Mat Med, 38(10):1471-1478. [郭冠瑛, 李明杰, 王鹏飞, 等, 2013. 地黄连作障碍中钙信号系统的异常变化分析[J]. 中国中药杂志, 38(10):1471-1478.]

HETHERINGTONA, TREWAVASA, 1982. Calcium-dependent protein kinase in pea shoot membranes[J]. Febs Lett, 145 (1):67-71.

HARMONA C, PUTNAM-EVANSC, CORMIERM J, 1987. A Calcium-dependent but calmodulin-independent protein kinase from soybean[J]. Plant Physiol, 83 (4):830-837.

JIANG SS,ZHANG D,WANG L, et al., 2013. A maize calcium-dependent protein kinase gene, *ZmCPK4*, positively regulated abscisic acid signaling and enhanced drought stress tolerance in transgenic *Arabidopsis*[J]. Plant Physiol Biochem,71:112-120.

LEI L, WANG L, YAO LN, et al., 2019. Identification and expression analysis of calcium-dependent protein kinase *CsCDPK*17 in tea plant (*Camellia sinensis*)[J]. J Tea Sci, 39(3):267-279.[雷蕾, 王璐, 姚丽娜, 等, 2019. 茶树钙依赖性蛋白激酶基因 *CsCDPK*17 的鉴定及表达分析[J]. 茶叶科学, 39(3):267-279.]

LI MY, HU W, REN LC, et al., 2019. Identification, expression, and interaction network analyses of the *CDPK* gene family reveal their involvement in the development, ripening, and abiotic stress response in banana[J]. Biochem Genet, 58:40-62.

LI HF, 2014. Summary on pharmacological action and clinical usage of *Rehmanniae radix*[J]. J Pharm Res, 33(6):345-347.[李慧芬, 2014. 地黄药理作用和临床应用概况[J]. 药学研究, 33(6):345-347.]

LIU HY, WANG F, WANG YP, et al.,2006. The causes and control of continuous cropping barrier in *Rehmannia glutinosa* Libosch. [J]. Acta Agric Boreal-Sin, (4):131-132. [刘红彦, 王飞, 王永平, 等, 2006. 地黄连作障碍因素及解除措施研究[J]. 华北农学报, (4):131-132.]

RAICES M, GARGANTINI PR, CHINCHILLA D, et al., 2003. Regulation of *CDPK* isoforms during tuber development[J]. Plant Mol Biol, 52(5):1011-1024.

ROMEIS T, PIEDRAS P, JONESJ DG, 2000. Resistance gene dependent activation of a calcium-dependent protein kinase in the plant defense response[J]. Plant Cell, 12(5):803-815.

SHENG K, GAO YH, SI JP, et al., 2017. Cloning and expression analysis of *DoCDPK6* gene and promoter from *Dendrobium officinale*[J]. J Agric Biotechnol, 25(4):588-598. [盛况，高燕会，斯金平，等, 2017. 铁皮石斛 *DoCDPK6* 基因及启动子的克隆与表达分析[J]. 农业生物技术学报, 25(4):588-598.]

TIAN XH, PANG XB, ZHU JB, et al., 2016. Effect of over-expression of *Saussurea involucrata SikCDPK*1 gene on improving cold tolerance in transgenic tobacco[J]. Acta Tabac Sin, 22(6):98-103[田晓涵，庞学兵，祝建波，等，2016. 过表达天山雪莲 *SikCDPK*1 基因提高转基因烟草耐低温能力的机制初探[J]. 中国烟草学报, 22(6):98-103]

WANG G, JING WM, CHEN YL, 2019. Causes and control measures of continuous cropping obstacles of vegetables[J]. NW Hortic, (4):53-54. [王刚，景炜明，陈永利, 2019. 蔬菜连作障碍原因与防治措施[J]. 西北园艺, (4):53-54.]

WANG C, 2008. Bioinformatics analysis of calcium-dependent protein kinase family in wheat genome[D]. Wuhan: Huazhong University Science Technology. [王晨，2008. 小麦基因组中钙依赖型蛋白激酶家族的生物信息学分析[D]. 武汉：华中科技大学]

YANG CY, LI XY, LI MJ, et al., 2017. Identification and analysis of the calcium signaling system genes responding to continuous cropping injury in *Rehmannia glutinosa* L.[J]. Acta Pharm Sin, 52(12): 1951-1961[杨楚韵，李鑫宇，李明杰，等，2017. 地黄钙信号体系相关基因的鉴定及其在连作条件下响应特征分析[J]. 药学学报, 52(12):1951-1961]

ZHANG H, CAI WW, ZHANG SZ, et al., 2010. Cloning and expression analysis of calcium-dependent protein kinase gene in *Dracaena draco* 2[J]. Chin J Trop Crops, 31(7):1130-1136.[张浩，蔡文伟，张树珍，等，2010. 龙血树*DCDPK*2基因的克隆及表达分析[J]. 热带作物报, 31(7):1130-1136.]

ZHANG YL, 2012. Cloning and expression analysis of *CDPK* gene family in maize and preliminary study of *ZmCPK*12 function[D]. Urumqi: Xinjiang Agricultural University. [张毓露，2012. 玉米 *CDPK* 基因家族的克隆，表达分析及 *ZmCPK12* 功能初探[D]. 乌鲁木齐：新疆农业大学.]